

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>A61K 38/55, 38/07, 38/08, A61P 37/00,</b> <b>A61K 38/16</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/59536</b>  <b>(43) Internationales</b> <b>Veröffentlichungsdatum:</b> 12. Oktober 2000 (12.10.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/03019  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 5. April 2000 (05.04.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 15 465.1      6. April 1999 (06.04.99)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> APOTECH RESEARCH AND DEVELOPMENT LTD. [CH/CH]; 84, rue du Rhône, CH-1204 Genf (CH).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BUDD, Ralph, C. [US/US]; 5 Harbor Ridge Road, South Burlington, VT 05403 (US). TSCHOPP, Jürg [CH/CH]; Ch. des Fontannins 10, CH-1066 Epalinges (CH). KATAOKA, Takao [JP/JP]; 3-32-15 Kitashinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0074 (JP).  <b>(74) Anwälte:</b> VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Friedrich, R. usw.; Widenmayerstrasse 5, D-80538 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> CASPASE INHIBITORS FOR INHIBITING BLOOD CELL PROLIFERATION AND FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES		
<b>(54) Bezeichnung:</b> CASPASE-INHIBITOREN ZUR PROLIFERATIONSHEMMUNG VON BLUTZELLEN UND ZUR BEHANDLUNG VON AUTOIMMUNKRANKHEITEN		
<b>(57) Abstract</b>  The invention relates to the use of a caspase inhibitor which incubates the proliferation of peripheral blood lymphocytes and is therefore particularly suitable for treating diseases or disorders that are caused by a hyperproliferation of peripheral blood lymphocytes. The invention also relates to the use of a caspase inhibitor for suppressing the immune system.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Caspase-Inhibitors, der die Proliferation von peripheren Blutlymphozyten inhibiert und damit insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen geeignet ist, die auf einer Hyperproliferation von peripheren Blutlymphozyten beruhen. Weiterhin wird die Verwendung eines Caspase-Inhibitors zur Suppression des Immunsystems offenbart.		

**CASPASE-INHIBITOREN ZUR PROLIFERATIONSHEMMUNG VON BLUTZELLEN UND ZUR BEHANDLUNG VON AUTOIMMUNKRANKHEITEN**

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Inhibitors von Cysteinaspertatproteasen (Caspasen), denen eine wichtige Funktion bei der intrazellulären Signaltransduktion zukommt, zur Proliferationshemmung von Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Inhibitors oder mehrerer solcher Inhibitoren zur Behandlung von Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zuständen, die ätiologisch auf einer Hyperproliferation von Lymphozyten beruhen, und die Verwendung eines solchen Inhibitors oder mehrerer solcher Inhibitoren zur Suppression der Immunantwort von Lymphozyten.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Caspasen (Cysteinaspertatproteasen) für die intrazelluläre Signaltransduktion gewisser exogener Apoptose-stimulierender Signale von erheblicher Bedeutung sind. Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologisch fein regulierten zielgerichteten Zelltod, der beispielsweise durch Bindung von Liganden an Rezeptoren, z.B. TNF-Bindung oder CD95 (Fas)-Bindung, durch Entzug gewisser Wachstumsfaktoren, durch Ablösung von einer extrazellulären

Matrix, durch ionisierende Strahlung, Staurosporin oder auch durch Glucokortikoide induziert werden kann. Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, daß insbesondere nach einer durch extrazelluläres sFasL, also löslichem Liganden des Fas-Rezeptors, induzierten Oligomerisierung des Rezeptors Fas (CD 95) eine Kaskade von proteolytischen Reaktionen ausgelöst wird, die schließlich in die Zellapoptose einmündet. Hierbei wird entsprechend der Caspasenfolge in der Kaskade die jeweils folgende Caspase durch proteolytische Spaltung aktiviert. Eine zentrale Funktion bei dieser apoptotischen Signaltransduktion nimmt am Ausgangspunkt der proteolytischen Kaskade die sogenannte Caspase-8 ein, die zum DISC-Komplex gehört und sich über das Linker-Protein FADD an den Fas-Rezeptor anlagert. Am DISC-Komplex wird die enzymatisch noch inaktive Procaspase-8 in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten gespalten, wodurch aktive Caspase-8 gebildet wird, die als Heterotetramer vom DISC-Komplex dissoziiert. Diese aktive Caspase-8 kann nunmehr beispielsweise die in der Kaskadenfolge weiter distal fungierenden Caspasen Caspase-3 oder Caspase-7 aktivieren.

Es ist weiterhin beschrieben, daß verschiedene Typen von Caspase-Inhibitoren existieren, die den apoptotischen Signaltransduktionsweg blockieren. Hierbei sind nicht biologisch auftretende Caspase-Inhibitoren von biologischen, beispielsweise viralen Caspase-Inhibitoren, zu unterscheiden.

Der Literatur ist bisher ausschließlich zu entnehmen, daß Caspasen in Zusammenhang mit der apoptotischen Signaltransduktion Bedeutung zukommt. Folglich ist auch den Caspase-Inhibitoren, seien sie natürlichen oder nicht natürlichen Ursprungs, ausschließlich eine Funktion bei der Inhibition der Apoptose zugeordnet worden. Weitere funktionelle Eigenschaften der Caspasen im intrazellulären Stoffwechsel - und damit auch weitere Verwendungsmöglichkeiten für Caspase-Inhibitoren - sind dagegen im Stand der Technik nicht beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt nunmehr die Aufgabe zugrunde, für einzelne Caspasen weitere funktionelle zellphysiologische Aktivitäten aufzufinden und damit neue Verwendungsmöglichkeiten

für Caspase-Inhibitoren, auch unter Berücksichtigung pathophysiologischer Aspekte, zu bestimmen.

Die vorliegende Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Ansprüche 1, 5, 7 und 8 gelöst.

Nach Anspruch 1 kann ein Caspase-Inhibitor auch zur Inhibierung der Proliferation von Peripheren Blutlymphozyten (PBL) eingesetzt werden. Diese Verwendungsmöglichkeit beruht auf der Erkenntnis, daß Caspasen nicht nur an der Weiterleitung exogener apoptotischer Signale beteiligt sind, sondern auch Funktionen bei der Proliferation von PBL nach entsprechender exogener Stimulierung übernehmen können. Dies läßt sich dadurch erklären, daß für die Proliferation von PBL zwei stimulierende Signale benötigt werden. Neben der seit langem bekannten stimulierenden Bindungsreaktion am T-Zellrezeptor-CD3-Komplex muß nämlich ein weiteres costimulatorisches Signal vorliegen. Dieser Costimulus ist die Bindung von extrazellulärem FasL an Fas mit anschließender intrazellulärer Signaltransduktion durch die Aktivierung von Caspasen. Damit wirkt extrazelluläres FasL costimulatorisch beispielsweise neben der Stimulation von T-Zellen am T-Zell-Rezeptor-(TCR)/CD3-Komplex.

Also weisen Caspasen eine Doppelfunktion auf, nämlich einerseits als Kaskadenglieder der apoptotischen Signaltransduktion und andererseits gemäß vorliegender Erfindung auch als intrazelluläre Elemente co-stimulatorischer exogener Signale für die PBL-Proliferation. Die Inhibition der Caspasen führt somit erfindungsgemäß auch zu einer Inhibition der PBL-Proliferation. Daher wirken Caspase-Inhibitoren gleichfalls als Inhibitoren der Proliferation von Lymphozyten und hierbei insbesondere von PBL. Caspase-Inhibitoren können also erfindungsgemäß die Proliferation von B- und insbesondere von T-Lymphozyten, vor allem bei im Blutkreislauf zirkulierenden Lymphozyten, inhibieren.

Dabei können die zur Proliferationshemmung eingesetzten Caspase-Inhibitoren ihre inhibitorische Wirkung durch reversible oder irreversible Inhibition einer Caspase oder auch

mehrerer Caspasen ausüben. Auf diese Weise wird die intrazelluläre Signalübertragung blockiert.

Insbesondere sind solche Caspase-Inhibitoren Gegenstand der vorliegenden Erfindung, die die Funktion der Caspase-8 inhibieren. Die Caspase-8-Inhibition kann beispielsweise durch solche Substanzen bedingt sein, die die Abspaltung der Prodomäne der Procaspase-8 verhindern. Auf diese Weise kann keine aktive Caspase-8-Fraktion gebildet werden, die die weitere Signaltransduktion erlauben könnte. Es ist aber durch die Verwendung solcher Caspase-Inhibitoren denkbar, die die enzymatische Aktivität der proteolytisch gespalteten - und somit aktiven Caspase-8-Fraktion blockieren. Dies ist z.B. durch Bindung an das aktive Zentrum der Caspase-8 möglich.

Gemäß dem Gegenstand des Anspruchs 5 liegt der vorliegenden Erfindung die Erkenntnis zugrunde, daß Caspase-Inhibitoren eingesetzt werden können, um solche Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zustände zu behandeln bzw. auf ihrer Basis zur Herstellung eines Arzneimittels zu dienen, das zur Behandlung derartiger Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zustände verwendet werden kann, die auf einer Hyperproliferation von PBL beruhen. Da erfindungsgemäß eine Co-Stimulation über FasL/FasR, die zur Aktivierung einer oder mehrerer Caspasen führt, für die Proliferation von PBL erforderlich ist, ist es mit Hilfe von Caspase-Inhibitoren möglich, eine pathophysiologische Hyperproliferation von PBL zu unterbinden. Der Einsatz von Caspase-Inhibitoren kann daher insbesondere bei Patienten indiziert sein, die Tumorerkrankungen des Lymphsystems aufweisen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Caspase-Inhibitoren dann, wenn die Tumorerkrankung auf einer Hyperproliferation von entarteten T- oder B-Lymphozyten beruht. Damit verbunden ist auch die Verwendung eines Caspase-Inhibitors oder mehrerer Caspase-Inhibitoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung derartiger Tumorerkrankungen.

Die Verwendung von Caspase-Inhibitoren ist aber auch zur Suppression einer überschießenden Immunantwort - sei es durch B-Lymphozyten, sei es durch T-Lymphozyten - angezeigt. Zu

beachten ist hier insbesondere, durch den Einsatz von Caspase-Inhibitoren solche Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zustände zu behandeln, bei denen sich die Immunabwehr gegen körpereigene Strukturen richtet. Bevorzugt ist daher die Verwendung von Caspase-Inhibitoren bei der Bekämpfung von Autoimmunkrankheiten.

Dabei sind in einer beispielhaften Aufzählung die Verwendung eines oder mehrerer Caspase-Inhibitoren zur Behandlung folgender Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischer Zustände bzw. die Verwendung eines oder mehrerer Caspase-Inhibitoren zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der folgenden Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zustände, die sich als Autoimmunkrankheiten darstellen, zu nennen: Rheumatoide Arthritis, Systemischen Lupus erythematosus, Diabetes mellitus oder Multiple Sklerose.

Weiterhin ist die Verwendung eines Caspase-Inhibitors oder die kombinierte Verwendung mehrerer Caspase-Inhibitoren dann vorteilhaft, wenn eine grundsätzliche Suppression des Immunsystems erwünscht ist. Dabei sind Caspase-Inhibitoren insbesondere zur Suppression der durch Periphere Blutlymphozyten (PBL) getragenen Immunantwort geeignet. Eine umfassende Immunsuppression ist vor allem nach Transplantationen allogener Zellen, Gewebe oder Organe indiziert. Durch den Einsatz von Caspase-Inhibitoren bzw. deren Einsatz zur Herstellung eines Arzneimittels kann dergestalt die Abstoßungsreaktion des transplantierten Patienten gegen Fremdzellen, Fremdgewebe oder Fremdorgane unterbunden werden, ohne daß schwerwiegende Nebenreaktionen zu erwarten sind.

Bei den Caspase-Inhibitoren kann es sich um solche Substanzen handeln, die natürlich auftreten und ggf. physiologisch bereits als Caspase-Inhibitoren wirken. Es kann sich bei den Caspase-Inhibitoren aber beispielsweise auch um organisch-chemische Molekülstrukturen oder um kurze, nicht natürliche Peptide handeln. Allgemein sind also nicht biologisch auftretende, die Caspasen inhibierende Substanzen bzw. Moleküle bevorzugt.

Bevorzugt sind dabei Oligo- oder Polypeptide, die die Caspasen als Inhibitoren blockieren können. Oligopeptide mit 3 bis 15 Aminosäuren Kettenlänge sind besonders geeignet, ganz besonders bevorzugt sind solche mit 3 bis 6 Aminosäuren Kettenlänge, wobei hierbei wiederum Tetrapeptide besonders vorteilhaft sind. Bei den Oligopeptiden kann es sich um Teilsequenzen natürlich auftretender und ggf. als Caspase-Inhibitoren wirkender Proteine handeln.

So können beispielsweise Teilsequenzen des bakteriellen Proteins CrmA eingesetzt werden. Derartige Caspase-Inhibitoren auf Peptidbasis können chemisch an reaktiven Gruppen der Aminosäure-Seitenketten, z.B. an Amino- oder Carboxygruppen, oder aber auch am jeweiligen N- bzw. C-Terminus des Peptids modifiziert sein. Derart kann beispielsweise die Stabilität des Inhibitors auf Peptidbasis erhöht oder die Passage des Inhibitors durch die Zellmembran erleichtert werden.

Als bevorzugte Modifizierungen am C-Terminus des Oligo- oder Polypeptids wären zu nennen: Aldehyd-Derivatisierung, die Einführung einer Fluoromethylketon- oder Acyloxymethylketon-gruppe.

Ganz besonders bevorzugt sind für die Verwendung als Caspase-Inhibitoren solche Peptide, die die Aminosäuresequenzen VAD, IETD oder YVAD (Ein-Buchstabencode) enthalten. Aber auch die Peptide, VAD, IETD oder YVAD, ggf. chemisch modifiziert, sind für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet. Insbesondere bevorzugt als Caspase-Inhibitoren zum Einsatz als Proliferationshemmer sind IETD-fmk, zVAD-fmk oder YVAD-fmk, also jeweils durch eine Fluoromethylketongruppe am C-Terminus modifizierte Peptide.

Neben nicht natürlichen Molekülstrukturen zur Verwendung als Inhibitoren der Zellproliferation umfaßt die vorliegende Erfindung auch jene biologisch auftretenden Substanzen, insbesondere Peptide oder Proteine, die sich physiologisch als wirksame Caspase-Inhibitoren erweisen. Dabei kann es sich um Substanzen viralen, bakteriellen oder eukaryotischen Ursprungs

handeln. Beispielhaft zu nennen wäre das bakterielle Protein CrmA.

Je nach Indikationsgebiet kann der Caspase-Inhibitor oder eine Kombination von zwei oder mehr Caspase-Inhibitoren in systemischer oder topischer Applikation eingesetzt werden. Bei systemischer Applikation kommen orale, intravenöse, intra-peritoneale oder intramuskuläre Verabreichungsformen in Betracht.

Ggf. werden zur Verwendung des Caspase-Inhibitors zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der zuvor genannten Erkrankungen oder Störungen Adjuvantien erforderlich sein. Die spezifische galenische Aufbereitung ist abhängig vom jeweiligen Indikationsgebiet und der gewünschten Verabreichungsform.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgend beschriebenen Figuren näher erläutert:

Figur 1 stellt die Wirkung von verschiedenen Caspase-Inhibitoren auf humane T-Zellen dar. Hierzu wurden die T-Zellen mit 10 µg/ml löslichem anti-CD3-Antikörper in Gegenwart verschiedener Caspase-Inhibitoren stimuliert. Herangezogen wurden die Inhibitoren IETD-fmk und zVAD-fmk (Inhibitoren der Caspase-8), YVAD-fmk (Inhibitor der Caspase-1) sowie zur Kontrolle DMSO in jeweils vergleichbarer Konzentration. Aufgetragen findet sich die Proliferation der stimulierten T-Zellen (cpm, gemessen durch [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation) als Funktion steigender Konzentrationen der Caspase-Inhibitoren. Insbesondere die beiden Caspase-8-Inhibitoren IETD-fmk und zVAD-fmk zeigen bei Konzentrationen oberhalb von 25 µM eine deutliche Inhibitionswirkung auf die Zellproliferation.

Figur 2 stellt die Effekte dar, die sich bei Zugabe von Fas-Fc bzw. IgG für die Proliferation von T-Lymphozyten ergeben. Dabei wurden die T-Lymphozyten mit Hilfe von immobilisiertem anti-CD3-Antikörper aktiviert (0,5 µg/ml). Während die dosisabhängige Zugabe von Fas-Fc die nach Ablauf von drei Tagen

gemessene Zellzahl (hier gemessen durch cpm) deutlich reduziert, hat die Zugabe von IgG keinerlei Wirkung auf die Zellproliferation. Das Ergebnis in Fig. 2 ist somit konsistent mit dem Modell, das postuliert, daß der immobilisierte FasL-Inhibitor Fas-Fc das für die Proliferation notwendige costimulierende Signal, nämlich die FasL/Fas-Bindung, blockiert.

Figur 3 gibt die spezifischen proliferationshemmenden Effekte von drei Caspase-Inhibitoren, nämlich YVAD-fmk, zVAD-fmk und IETD-fmk, wieder. Hierzu wurden PBL jeweils mit den zuvor bezeichneten Caspase-Inhibitoren kultiviert und dann mit 3 µm/ml löslichem anti-CD3-Antikörper und "crosslinked" sFasL stimuliert (50 ng/ml). "Crosslinked" sFasL stellt oligomerisiertes sFasL dar. Das sFasL trägt eine FLAG-Sequenz, an die kreuzweise vernetzende anti-FLAG-Antikörper binden, was zur Oligomerisierung führt. Ähnlich wie in Fig. 1 erweisen sich auch bei kombinierter Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper und FasL die Caspase-8-Inhibitoren als die wirksamsten T-Zell-Proliferationshemmer.

In Figur 4 wird die Korrelation von IL-2 Expression und dem Einsatz von Caspase-Inhibitoren anhand eines Balkendiagramms deutlich. Es wird einerseits erkennbar, daß die kombinierte Stimulierung von anti-CD3-Antikörpern und FasL eine - gegenüber einer ausschließlich mit anti-CD3-Antikörpern durchgeführten Aktivierung (hier als Kontrolle bezeichnet) - signifikant erhöhte IL-2-Produktion zur Folge hat. Andererseits erweisen sich auch hier die Caspase-8-Inhibitoren IETD-fmk und zVAD-fmk bei anti-CD3-Antikörper-Stimulierung als besonders wirksam in bezug auf die Suppression der IL-2-Produktion. Das in Figur 4 dargestellte Ergebnis beruht auf Versuchen, bei denen  $10^6$  PBL/ml mit immobilisiertem anti-CD3-Antikörper (3 µg/ml) und FasL (50 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von den zuvor bezeichneten Caspase-Inhibitoren (50 µM) kultiviert wurden. Die Überstände wurden nach 24 Std. abgenommen und mit Hilfe eines CTLL-Bioassays auf ihre IL-2-Konzentration hin untersucht.

In Figur 5 wird gezeigt, daß die T-Zell-Proliferationshemmung von Caspase-8-Inhibitoren, hier am Beispiel von zVAD-fmk, durch die Zugabe von IL-2 aufgehoben werden kann. Dies bedeutet, daß die Aktivität von Caspase-8 für die IL-2-Produktion der T-Zellen wesentlich ist. Bei den der Figur 5 zugrundeliegenden Versuchen wurden PBL mit 10 µg/ml löslichem anti-CD3-Antikörper in der An- oder Abwesenheit von zVAD-fmk (50 µM) bzw. in der Anwesenheit von anti-CD3-Antikörper-zVAD-fmk und 500 U/ml rekombinantem humanen IL-2 aktiviert. Während erfindungsgemäß die Zugabe von zVAD-fmk eine gegenüber der Kontrolle deutliche Verringerung der Zellzahl zum Beobachtungszeitpunkt bewirkt, wird bei Zugabe von IL-2 die Zellproliferation dramatisch gesteigert.

Figur 6 stellt einen sogenannten Western-Blot dar. Humane T-Zellen wurden entweder ohne Stimulierung (Kontrolle) mit löslichem anti-CD3-Antikörper allein (3 µg/ml) oder mit anti-CD3-Antikörper und sFasL (50 ng/ml), das wie oben beschrieben kreuzweise über seine Flag-Sequenz vernetzt ist, kultiviert. Die Zellysate wurden nach den in Figur 6 angegebenen Zeitpunkten hinsichtlich der Expression von Procaspase-8 bzw. von Spaltprodukten der Procaspase-8 untersucht. Hierbei indiziert der schwarze Pfeil die Lage der enzymatisch inaktiven Procaspase-8 im Western-Blot, während der offene Pfeil das enzymatisch aktive, proteolytisch gespaltene 26 kDa-Fragment anzeigt. Aus Figur 6 ist deutlich erkennbar, daß vier Stunden nach Kultivierungsbeginn in den Zellysaten die größte Konzentration an aktiver Caspase-8 vorliegt. Hierbei zeigt der Versuchsansatz mit kombinierter Zellstimulation durch anti-CD3-Antikörper und FasL eine gegenüber der ausschließlich durch anti-CD3-Antikörper hervorgerufenen T-Zell-Stimulierung signifikant erhöhte aktive Caspase-8-Fraktion. In einem weiteren Versuchsansatz (Figur 6, Western-Blot, rechts) wurden T-Zellen mit einer Kombination von anti-CD3-Antikörpern und FasL für die Dauer von 6 Stunden stimuliert, und zwar in Gegenwart von 50 µM des Caspase-8-Inhibitors IETD-fmk. Auf Grund der Wirkung des Caspase-8-Inhibitors wurde die Spaltung von Caspase-8 während der Stimulierung blockiert, eine 26 kDa-Fraktion ist im Western-Blot in diesem Fall nicht detektierbar.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert:

#### 1. Ausführungsbeispiel

Um die Aktivität von Caspase-Inhibitoren als Inhibitoren der Zellproliferation nachzuweisen, wurde deren Wirkung auf humane Periphere Blutlymphozyten untersucht.

Hierzu wurden diese durch eine Ficoll-Hypaque-Zentrifugation präpariert. Die Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen pro "well") wurden dann auf 96-"well"-Platten in Anwesenheit verschiedener Caspase-Inhibitoren bzw. zur Kontrolle in deren Abwesenheit kultiviert. Die Konzentration der Caspase-Inhibitoren wurde in einem Bereich von 25 bis 100  $\mu\text{M}$  variiert. Anschließend erfolgte eine Stimulierung der Zellen durch anti-CD3-Antikörper (TR66) bzw. durch eine kombinierte Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper und löslichem rekombinaten FasL mit oder ohne anti-Flag-Sequenz-Antikörper (1  $\mu\text{g/ml}$ ).

Während der letzten 18 Stunden der viertägigen Kultivierung wurde die Zellproliferation gemessen. Meßgröße der Zellproliferation war die Inkorporation von [ $^3\text{H}$ ]Thymidin in die proliferierenden Zellen.

Die eingesetzten Caspase-Inhibitoren (YVAD-fmk, zVAD-fmk und IETD-fmk) waren Produkte von Bachem und von Enzyme System Products. Das rekombinate FasL stammte von Alexis.

Die eingesetzten Caspase-Inhibitoren bewirken im Falle von IETD-fmk bzw. zVAD-fmk eine vollständige Inhibition der durch die anti-CD3-Antikörper hervorgerufenen Stimulierung. Der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk läßt eine partielle Inhibition der Zellproliferation erkennen (Figur 1).

Auch die kombinierte Stimulierung der humanen Peripheren Lymphozyten durch anti-CD3-Antikörper und FasL führt zu einem

ähnlichen Ergebnis in bezug auf die Aktivität der eingesetzten Caspase-Inhibitoren (Figur 3).

## 2. Ausführungsbeispiel

Durch ein weiteres Versuchssystem wurde die Inhibition der Proliferation in der Fraktion der T-Lymphozyten durch Caspase-Inhibitoren bestimmt.

Hierzu wurden T-Lymphozyten ( $10^6$ /ml) 24 h mit immobilisiertem anti-CD3-Antikörper (3 µg/ml) mit oder ohne "cross-linked" FasL (50 ng/ml) stimuliert. Die Überstände von solchen Ansätzen mit einem Caspase-Inhibitor bzw. ohne Caspase-Inhibitor als Kontrolle wurden nach der Stimulationszeitraum abgenommen und deren jeweilige IL-2-Konzentration mittels eines CTLL-Bioassays bestimmt. Die IL-2-Konzentration in den Überständen spiegelt dabei die T-Zellproliferation wider.

Im Ergebnis zeigt sich, daß die Gegenwart von Caspase-Inhibitoren, insbesondere von zVAD-fmk und IETD-fmk, die T-Zellproliferation blockiert. In diesen Versuchsansätzen ist nur eine schwache IL-2-Aktivität zu beobachten (Figur 4). Zwei Versuchsansätze ohne Caspase-Inhibitor-Zugabe dienen als Maßstab für die Beurteilung der nach Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper bzw. in Kombination mit FasL zu erwartenden IL-2-Produktion (Figur 4, Balken links bzw. rechts).

Durch Zugabe von exogenem rekombinanten IL-2 kann die Proliferationsinhibition in jenen Ansätzen mit Caspase-Inhibitor wieder aufgehoben werden. Eine gegenüber dem Kontrollansatz stark erhöhte [ $^3$ H]Thymidin-Inkorporation kann in diesem Fall gemessen werden (Figur 5).

## 3. Ausführungsbeispiel:

In diesem Ausführungsbeispiel wurden ruhende humane T-Lymphozyten unter verschiedenen Bedingungen kultiviert: (i) als Kontrolle ohne Stimulierung, (ii) ausschließliche Stimulierung

mit löslichem anti-CD3-Antikörper (3 µg/ml) oder (iii) kombinierte Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper und sFasL (50 µg/ml, kreuzweise vernetzt über die FLAG-/Sequenz-"cross-linked").

Aus den verschiedenen Ansätzen wurden nach 0, 2, 4, 6 und 22 h Zellen entnommen und lysiert. Die Zellysate wurden durch die Western-Blot-Technik hinsichtlich ihrer Caspase-8-Aktivität (Procaspase-8, 55 kDa-Fraktion, bzw. proteolytisch gespaltene, aktive Caspase-8, 26 kDa-Fraktion) untersucht.

Eine Bande der aktiven 26 kDa-Fraktion erscheint nur nach Stimulierung mit anti-CD3-Antikörper bzw. intensiver nach kombinierter Stimulierung mit sFasL. 4 h nach Stimulierungsbeginn liegt die aktive 26 kDa-Caspase-8-Fraktion, die durch Proteolyse aus der 55 kDa-Fraktion entsteht, in ihrer höchsten Konzentration vor (Figur 6).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden ruhende T-Lymphozyten in Gegenwart des Caspase-Inhibitors IETD-fmk (50 µM) mit anti-CD3-Antikörper und "cross-linked" sFasL stimuliert (s.o.) und 6 h nach Stimulierungsbeginn lysiert. Die Western-Blot-Auftragung läßt - im Gegensatz zum Versuchsansatz ohne Caspase-Inhibitor - keine 26 kDa-Bande erkennen (Figur 6, rechts). Dies weist nach, daß die proteolytische Spaltung von Caspase-8 auch im Falle der Co-Stimulierung mit sFasL durch IETD-fmk wirksam blockiert wird.

## **Ansprüche**

1. Verwendung eines Caspase-Inhibitors, dadurch gekennzeichnet, daß er die Proliferation von Peripheren Blutlymphozyten inhibiert.
2. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er die Proliferation von T-Lymphozyten inhibiert.
3. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er die Transduktion von die Zellproliferation stimulierenden Signalen durch reversible oder irreversible Inhibition einer oder mehrerer Caspase(n) intrazellulär blockiert.
4. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß er die Transduktion von die Zellproliferation stimulierenden Signalen blockiert, indem die Caspase-8 inhibiert wird.
5. Verwendung eines oder mehrerer Caspase-Inhibitors/en zur Behandlung von Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zuständen, dadurch gekennzeichnet, daß diesen Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zuständen eine Hyperproliferation von Peripheren Blutlymphozyten zugrundeliegt.
6. Verwendung eines Caspase-Inhibitors oder mehrerer Caspase-Inhibitoren zur Behandlung von Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zuständen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei diesen Erkrankungen, Störungen oder pathophysiologischen Zuständen um Autoimmunkrankheiten handelt.
7. Verwendung eines Caspase-Inhibitors oder mehrerer Caspase-Inhibitoren zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten gemäß

Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Autoimmunerkrankungen um Rheumatoide Arthritis, Systemischen Lupus erythematosus, Diabetes mellitus oder Multiple Sklerose handelt.

8. Verwendung eines Caspase-Inhibitors oder mehrerer Caspase-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß er/sie zur Suppression des Immunsystems, insbesondere zur Suppression der Immunantwort durch PBL, eingesetzt wird/werden.

9. Verwendung eines Caspase-Inhibitors oder mehrerer Caspase-Inhibitoren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß er/sie zur Suppression der Immunantwort, insbesondere zur Suppression der Immunantwort durch PBL, nach allogener Zell-, Gewebe- oder Organtransplantation eingesetzt wird/werden.

10. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß er eine nicht biologisch auftretende Molekülstruktur aufweist.

11. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Oligo-, insbesondere ein Tetrapeptid, oder ein Polypeptid ist.

12. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß er als Oligo- oder Polypeptid am N- oder C-Terminus eine Modifizierung aufweist.

13. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der C-Terminus des Oligo- oder Polypeptids eine Aldehyd-Derivatisierung, ein Fluoromethylketon oder ein Acyloxymethylketon aufweist.

14. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß er als Oligo- oder Polypeptid die Sequenzen VAD, IETD oder YVAD enthält.

15. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß er IETD-fmk ist.

16. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß er zVAD-fmk ist.

17. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß er YVAD-fmk ist.

18. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß er biologischen Ursprungs ist.

19. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er viralen, bakteriellen oder eukaryotischen Ursprungs ist.

20. Verwendung eines Caspase-Inhibitors gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß er das bakterielle Protein CrmA oder eine physiologisch aktive Teilsequenz von CrmA ist.

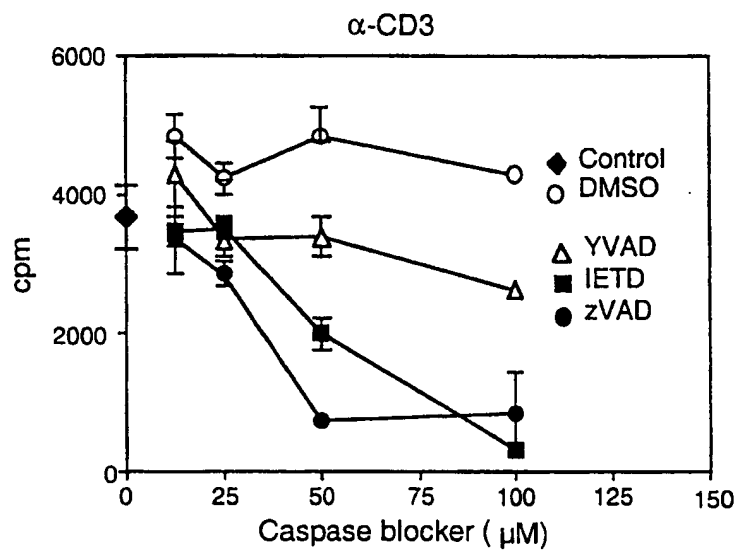


Fig. 1

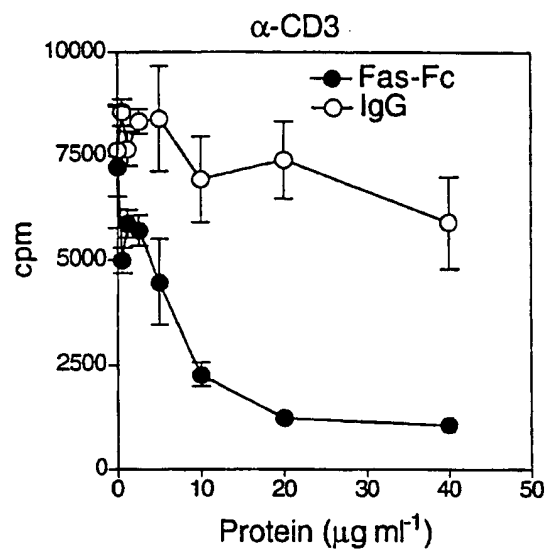


Fig. 2

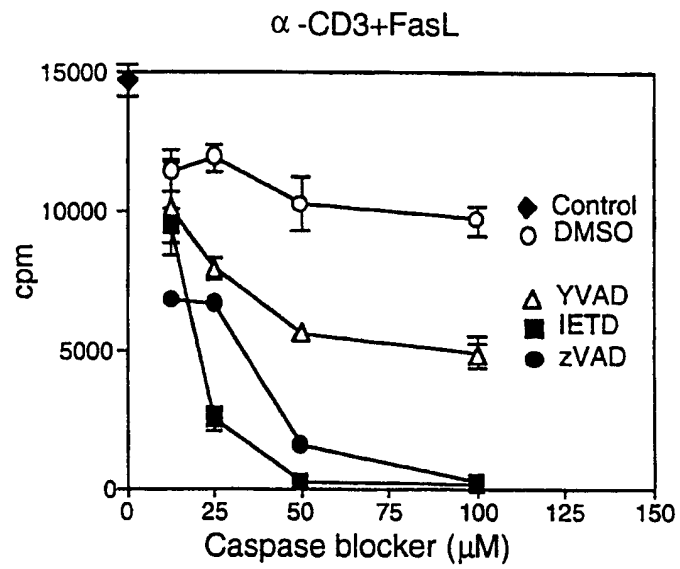


Fig. 3

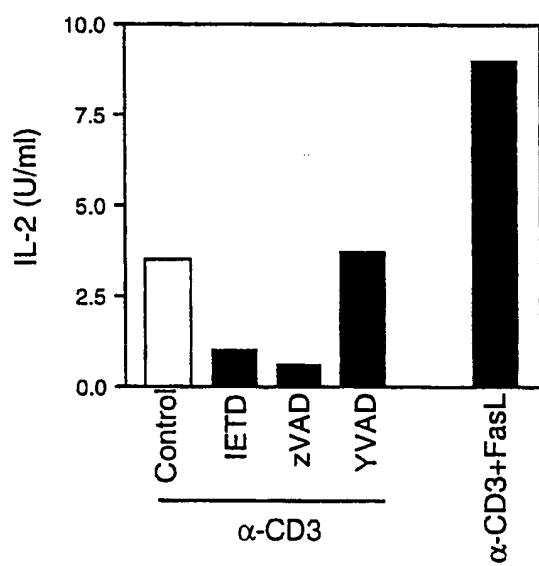


Fig. 4

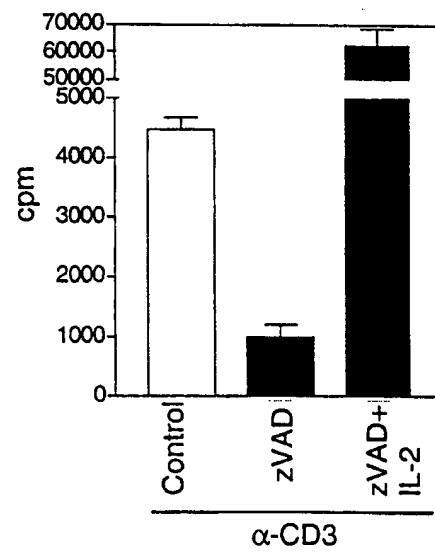


Fig. 5

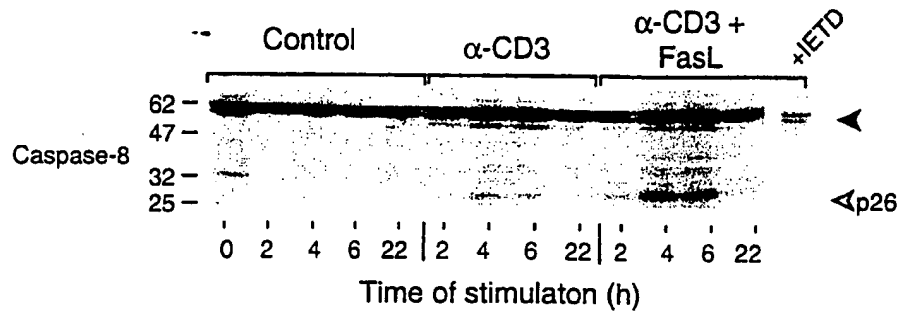
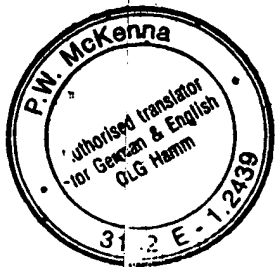


Fig. 6



20-07-2001

1

EP00030

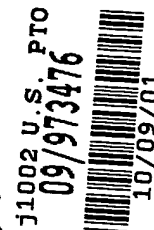
PCT/Epoo/03019

19 July 2001

APOTECH Research and Development Ltd.

AP01P008WO

(Modified) Claims



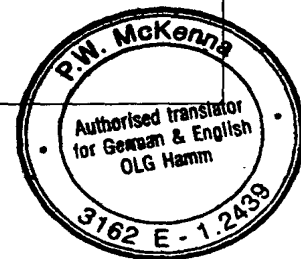
1. Use of a caspase-8 inhibitor or of several caspase-8 inhibitors to manufacture a medicament for suppressing the immune system after allogenic cell, tissue or organ transplantations or to treat tumour diseases of the lymphatic system, whereby the use of compositions for the manufacture of a medicament which have a corticosteroid, a caspase-8 inhibitor and pharmaceutically suitable carrier material is disclaimed.
2. Use of a caspase-8 inhibitor or of several caspase-8 inhibitors to manufacture a medicament in accordance with claim 1 for suppressing the immune response through PBL.
3. Use of a caspase inhibitor in accordance with one of the claims 1 or 2 characterized by the caspase inhibitor having a non-biologically occurring molecular structure.
4. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 3 characterized by its being an oligopeptide, in particular a tetrapeptide, or a polypeptide, in particular a partial sequence of a native protein.
5. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 3 or 4 characterized by its having, as an oligopeptide or a polypeptide, a modification at the N-terminus or the C-terminus.

AMENDED PAGE

I certify that the above is a true and complete translation of the original.  
Thursday, 27 September 2001.

*P.W. McKenna*

P.W. McKenna, authorized translator for German and English,  
OLG (Higher Regional Court), Hamm, Germany.  
No. 3162 E - 1.2439



6. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 5 characterized by the C-terminus of the oligopeptide or polypeptide having an aldehyde derivatization, a fluoromethylketone or an acyloxymethylketone.
7. Use of a caspase inhibitor in accordance with one of the claims 3 to 6 characterized by its being an oligopeptide or a polypeptide containing the sequence IETD.
8. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 6 or 7 characterized by its being IETD-fmk.
9. Use of a caspase inhibitor in accordance with one of claims 1 or 2 characterized by its having a biological origin.
10. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 9 characterized by its having a viral, bacterial or eukaryotic origin.

**CASPASE INHIBITORS FOR INHIBITING THE PROLIFERATION OF BLOOD CELLS AND FOR  
TREATING AUTOIMMUNE DISEASES**

The invention relates to the use of an inhibitor of cysteine aspartate proteins (caspases), which have an important function in intracellular signal transduction, to inhibit the proliferation of cells. The invention also relates to the use of an inhibitor of this kind or of several such inhibitors to treat diseases, disorders or pathophysiological states which are based aetiologically on a hyperproliferation of lymphocytes and the use of an inhibitor of this type or of several such inhibitors to suppress the immune response of lymphocytes.

It is known from the literature that caspases (cysteine aspartate proteins) are of considerable importance for the intracellular signal transduction of certain apoptosis-stimulating signals. Apoptosis here is physiologically finely regulated targeted cellular death, which can be induced, for example, by binding ligands to receptors, e.g. TNF binding or CD95 (Fas) binding, by withdrawing defined growth factors, by removal from an extracellular matrix, by ionizing radiation, stauro-

sporin or even through glucocorticoids. It is also known from the literature that, in particular after an oligomerization of the Fas receptor (CD 95) induced by extracellular sFasL, i.e. by a soluble ligand of the Fas receptor, a cascade of proteolytic reactions is triggered which finally ends in cell apoptosis. Here, each subsequent caspase is activated through proteolytic cleavage in accordance with the caspase sequence in the cascade. A central function in this apoptotic signal transduction is taken up at the starting point of the proteolytic cascade by the so-called caspase-8, which belongs to the DISC complex and which settles on the Fas receptor through the linker protein FADD. In the DISC complex the procaspase-8, which is still inactive enzymatically, is cleaved into two subsequent reaction steps, through which active caspase-8 is formed which dissociates from the DISC complex as a heterotetramer. This active caspase-8 can now, for example, activate the caspases which are still functioning distally in the cascade sequence, namely caspase-3 or caspase-7.

It has also been written that different types of caspase inhibitors exist which block the apoptotic signal transduction path. Here, non-biologically occurring caspase inhibitors are to be differentiated from biological, e.g. viral, caspase inhibitors.

Up to now the literature has shown exclusively that caspases become important in connection with apoptotic signal transduction. Consequently, caspase inhibitors, whether they have natural or non-natural origins, have also only been assigned a function in the inhibition of the apoptosis. In contrast, the state of the art does not describe other functional characteristics of caspases in intracellular metabolism, and therefore other possibilities for using caspase inhibitors.

The present invention is based on the object of finding other functional cell-physiological activities for individual caspases and therefore determining new possibilities for using caspase inhibitors, including under pathophysiological aspects.

The current task is solved in accordance with the invention by claims 1, 5, 7 and 8.

According to claim 1, a caspase inhibitor can also be used to inhibit the proliferation of peripheral blood lymphocytes (PBL). This possible use is based on the finding that caspases not only participate in the transmission of exogenous apoptotic signals, but can also take over functions in the proliferation of PBL in accordance with corresponding exogenous stimulation. This can be explained by the fact that two stimulating signals are required for the proliferation of PBL. Together with the stimulating binding reaction at the T-cell receptor CD3 complex, which has been known for some time, there must also be a further co-stimulating signal. This co-stimulus is the binding of extracellular FasL to Fas with subsequent intracellular signal transduction through the activation of caspases. In this way, extracellular FasL has a co-stimulating effect for example together with the stimulation of T-cells at the T-cell receptor (TCR)/CD3 complex.

Caspases therefore have a twin function, namely, on the one hand, as cascade members of apoptotic signal transduction and, on the other hand, in accordance with the present invention as intracellular elements of co-stimulating exogenous signals for PBL proliferation as well. Inhibition of the caspases leads therefore in accordance with the present invention to inhibition of PBL proliferation. This is why caspases also have an effect as inhibitors of the proliferation of lymphocytes and here in particular of PBL. In accordance with the present in-

vention, therefore, caspase inhibitors can inhibit the proliferation of B and in particular of T-lymphocytes, above all with lymphocytes circulating in the cardiovascular system.

The caspase inhibitors used to inhibit proliferation can exercise their inhibitory effect through reversible or through irreversible inhibition of a caspase or of several caspases. Intracellular signal transmission is blocked in this way.

Caspase inhibitors which inhibit the function of caspase-8 are in particular the object of the present invention. Caspase-8 inhibition can be necessitated, for example, by substances which prevent the cleaving of the prodomain of the pro-caspase-8. In this way, an active caspase-8 fraction cannot be formed which would permit the further transduction of the signal. It is also conceivable through the use of caspase inhibitors of this type which block the enzymatic activity of the proteolytically cleaved, and therefore active, caspase-8 fraction. This is possible, e.g., through binding to the active centre of the caspase-8.

In accordance with the object of claim 5 the present invention is based on the finding that caspase inhibitors can be used to treat diseases, disorders or pathophysiological conditions or to serve on their basis for the production of a medicament which can be used to treat diseases, disorders or pathophysiological conditions of types which are caused by a hyperproliferation of PBL. Because, in accordance with the present invention, co-stimulation through FasL/FasR, which leads to activation of one or more caspases, is necessary for the proliferation of PBL, it is possible with the help of caspase inhibitors to prevent pathophysiological proliferation of PBL. The use of caspase inhibitors can therefore be indicated with patients who have tumour diseases of the lymphatic system. The use of caspase inhibitors is particularly advantageous if the

tumour disease is based on hyperproliferation of degenerate T- or B-lymphocytes. Linked with this is the use of a caspase inhibitor or of several caspase inhibitors to produce a medicament for the treatment of diseases of this kind.

The use of caspase inhibitors is also indicated to suppress an excessive immune response, whether through B-lymphocytes or through T-lymphocytes. Here in particular the use of caspase inhibitors should be noted to treat diseases, disorders or pathophysiological conditions in which the immune defences are directed against the body's own structures. For this reason, the use of caspase inhibitors to combat autoimmune diseases is preferred.

A list is given here of examples of the use of one or more caspase inhibitors to treat the following diseases, disorders or pathophysiological conditions or the use of one or more caspase inhibitors to produce a medicament to treat the following diseases, disorders or pathophysiological conditions, which are seen as autoimmune diseases: rheumatoid arthritis, systemic Lupus erythematosus, diabetes mellitus or multiple sclerosis.

In addition, the use of a caspase inhibitor or the combined use of several caspase inhibitors is then advantageous if a fundamental suppression of the immune system is desired. Here, caspase inhibitors are particularly suitable for suppressing the immune response supported by peripheral blood lymphocytes (PBL). Wide-ranging immune suppression is indicated above all following transplantations of allogenic cells, tissue or organs. The transplant patient's rejection response to foreign cells, foreign tissue or foreign organs can be repressed through the use of caspase inhibitors or by their use to produce a medicament, without serious side effects being expected.

The caspase inhibitors may be substances which occur naturally and may also already have a physiological effect as caspase inhibitors. However, the caspase inhibitor may also be, for example, organic-chemical molecule structures or short non-natural peptides. In general, non-biologically occurring substances or molecules respectively which inhibit the caspases are preferred.

Oligopeptides or polypeptides are preferred here which can block the caspases as inhibitors. Oligopeptides with 3 to 15 amino acid chain lengths are particularly suitable, those with 3 to 6 amino acid chain lengths are specially preferred, whereby tetrapeptides are particularly advantageous here. The oligopeptides may be part sequences of naturally occurring proteins which may also have the effect of caspase inhibitors.

For example, part sequences of the bacterial protein CrmA can be used. Caspase inhibitors of this type on a peptide base can be modified chemically at reactive groups of the amino acid side-chains, e.g. at amino or carboxy groups, or at the respective N- or C-terminus of the peptide. In this way, for example the stability of the peptide-based inhibitor can be increased or the passage of the inhibitor through the cell membrane can be made easier.

Preferred modifications at the C-terminus of the oligopeptide or polypeptide would be: aldehyde derivatization, the introduction of a fluoromethylketone or an acyloxymethylketone group.

Peptides which contain the amino acid sequences VAD, IETD or YVAD (single-letter code) are very particularly preferred for use as caspase inhibitors. However, the peptides VAD, IETD or YVAD, where necessary chemically modified, are also suitable for use in accordance with the present invention. Particularly

preferred for use as caspase inhibitors to inhibit proliferation are IETD-fmk, zVAD-fmk or YVAD-fmk, in other words peptides modified in each case by a fluoromethylketone group at the C-terminus.

Along with non-natural molecule structures for use as inhibitors of cell proliferation, the present invention also covers those biologically occurring substances, in particular peptides or proteins, which prove physiologically to be effective caspase inhibitors. These may be substances of viral, bacterial or eukaryotic origin. The bacterial protein CrmA might be referred to as an example.

Depending on the indication area the caspase inhibitor or a combination of two or more caspase inhibitors can be used in systemic or topical application. In the case of systemic application oral, intravenous, interperitoneal or intramuscular forms of administration can be considered.

Where applicable, adjuvants are necessary for the use of the caspase inhibitor for producing a medicament for the treatment of the diseases or disorders referred to above. The specific galenic preparation depends on the respective indication area and on the desired form of administration.

The present invention is explained in detail by the following figures:

Fig. 1 shows the effect of different caspase inhibitors on human T-cells. For this purpose the T-cells were stimulated with 10 µg/ml soluble anti-CD3 antibodies in the presence of various caspase inhibitors. The inhibitors IETD-fmk and zVAD-fmk (caspase-8 inhibitors), YVAD-fmk (caspase-1 inhibitor) were used, as well as DMSO for control purposes in comparable concentrations in each case. Plotted, the proliferation of the stimulated T-cells (cpm, measured by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation)

is found as a function of increasing concentrations of caspase inhibitors. In particular, with concentrations above 25  $\mu$ M the two caspase-8 inhibitors IETD-fmk and zVAD-fmk display a clear inhibiting effect on cell proliferation.

Fig. 2 shows the effects that result from an addition of Fas-Fc or IgG for the proliferation of T lymphocytes. Here the T-lymphocytes were activated with the help of immobilised anti-CD3 antibodies (0.5  $\mu$ g/ml). Whereas the dose-dependent addition of Fas-Fc clearly reduces the number of cells measured after the expiry of three days (measured here with cpm), the addition of IgG has no effect at all on cell proliferation. The result in Fig. 2 is thus consistent with the model which postulates that the immobilised FasL inhibitor Fas-Fc blocks the co-stimulating signal which is necessary for proliferation, namely FasL/Fas binding.

Fig. 3 shows the specific proliferation inhibiting effects of three caspase inhibitors, namely YVAD-fmk, zVAD-fmk and IETD-fmk. For this purpose, PBL were cultivated in each case with the caspase inhibitors referred to above and then stimulated (50 ng/ml) with 3  $\mu$ M/ml soluble anti-CD3 antibodies and cross-linked sFasL. Cross-linked sFasL represents oligomerized sFasL. The sFasL carries a FLAG sequence to which the cross-wise networking anti-FLAG antibodies bind, which leads to oligomerizing. Similar to what was proved in Fig. 1, the caspase-8 inhibitors prove to be the most effective T-cell proliferation inhibitors even with combined stimulation with anti-CD3 antibodies and FasL.

Fig. 4 makes clear the correlation of IL-2 expression and the use of caspase inhibitors using a bar diagram. On the one hand it can be seen that the combined stimulation of anti-CD3 antibodies and FasL shows significantly increased IL-2 production as a consequence as compared with activation carried out

solely with anti-CD3 antibodies (described here as control). On the other hand, with anti-CD3 antibody stimulation the caspase-8 inhibitors IETD-fmk and zVAD-fmk prove here as well to be particularly effective with regard to the suppression of IL-2 production. The findings shown in Fig. 4 are based on experiments in which  $10^6$  PBL/ml were cultivated with immobilised anti-CD3 antibody (3  $\mu$ g/ml) and FasL (50 ng/ml) in the presence or absence of the caspase inhibitors referred to above (50  $\mu$ M). The supernatants were removed after 24 hours and examined with the help of a CTLL bioassay for their IL-2 concentration.

Fig. 5 shows that the inhibition of T-cell proliferation of caspase-8 inhibitors, here using zVAD-fmk as an example, can be cancelled by adding IL-2. This means that the activity of caspase-8 is significant for the IL-2 production of the T-cells. In the experiments on which Fig. 5 is based PBL were activated with 10  $\mu$ g/ml soluble anti-CD3 antibody in the presence or absence of zVAD-fmk (50  $\mu$ M) and in the presence of anti-CD3 antibody zVAD-fmk and 500 U/ml recombinant human IL-2 respectively. While in accordance with the present invention the addition of zVAD-fmk has the effect of a clear reduction of the number of cells as against the control at the time of observation, cell proliferation increases dramatically with the addition of IL-2.

Fig. 6 shows a so-called Western blot. Human T-cells were cultivated either without stimulation (control) with soluble anti-CD3 antibody alone (3  $\mu$ g/ml) or with anti-CD3 antibody and sFasL (50 ng/ml) which, as described above, is cross-linked via its flag sequence. The cell lysates were examined in accordance with the times shown in Fig. 6 with regard to the expression of procaspase-8 or of cleavage products of the procaspase-8. The black arrow here indicates the position of the enzymatically inactive procaspase-8 in the Western blot, while

the open arrow indicates the enzymatically active, proteolytically cleaved 26 kDa fragment. Fig. 6 shows clearly that the highest concentration of active caspase-8 in the cell lysates is found four hours after the start of cultivation. Here the test approach with combined cell stimulation through anti-CD3 antibody and FasL shows a significantly increased active caspase-8 fraction as against the T-cell stimulation which was brought about solely through anti-CD3 antibody. In a further experimental approach (Fig. 6, Western blot, right) T-cells were stimulated with a combination of anti-CD3 antibodies and FasL for a period of 6 hours, namely in the presence of 50  $\mu$ M of the caspase-8 inhibitor IETD-fmk. Because of the effects of the caspase-8 inhibitor the cleavage of caspase-8 during the stimulation was blocked, a 26 kDa fraction cannot be detected in the Western blot in this case.

The present invention is explained in detail by means of the following embodiments:

#### Embodiment 1

To verify the activity of caspase inhibitors as inhibitors of cell proliferation their effect on human peripheral blood lymphocytes was examined.

For this purpose, the latter were prepared through Ficoll-Hypaque centrifugation. The cells ( $5 \times 10^4$  cells per well) were then cultivated on 96-well plates in the presence of different caspase inhibitors, or, for control purposes, in their absence. The concentration of the caspase inhibitors was varied in a range of 25 to 100  $\mu$ M. Finally the cells were stimulated through anti-CD3 antibodies (TR66) or through a combined stimulation with anti-CD3 antibodies and soluble recombinant FasL with or without anti-flag sequence antibodies (1  $\mu$ g/ml).

Cell proliferation was measured during the last 18 hours of the four-day cultivation period. The measuring variable for cell proliferation was the incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine into the proliferating cells.

The caspase inhibitors which were used (YVAD-fmk, zVAD-fmk and IETD-fmk) were products from Bachem and Enzyme System Products. The recombinant FasL came from Alexis.

In the case of IETD-fmk and zVAD-fmk the caspase inhibitors which were used brought about complete inhibition of the stimulation brought about by the anti-CD3. The caspase inhibitor zVAD-fmk permits a partial inhibition of the cell proliferation to be detected (Fig. 1).

The combined stimulation of the human peripheral lymphocytes through anti-CD3 antibodies and FasL leads as well to similar results with regard to the activity of the caspase inhibitors which were used (Fig. 3).

## Embodiment 2

The inhibition of the proliferation in the fraction of the T lymphocytes through caspase inhibitors was determined in a second experimental system.

For this purpose T lymphocytes ( $10^6$ /ml) were stimulated with immobilized anti-CD3 antibody (3  $\mu$ g/ml) with or without cross-linked FasL (50 ng/ml). The supernatants of these preparations with a caspase inhibitor or without a caspase inhibitor as control were removed after the stimulation period and their respective IL-2 concentration was measured using a CTTL bioassay. The IL-2 concentration in the supernatants reflects the T-cell proliferation.

The results show that the presence of caspase inhibitors, in particular of zVAD-fmk and IETD-fmk, blocks T-cell prolifera-

tion. In these test preparations only weak IL-2 activity can be seen (Fig. 4). Two test preparations without the addition of a caspase inhibitor serve as a measure for the assessment of the production of IL-2 which is to be expected after stimulation with anti-CD3 antibody or in combination with FasL (Fig. 4, bar left and right, respectively).

The inhibition of proliferation in these preparations with a caspase inhibitor can be cancelled out by adding exogenous recombinant IL-2. Greatly increased [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation as against the control preparation can be measured in this case (Fig. 5).

#### Embodiment 3:

In this embodiment, inactive human T lymphocytes were cultivated under different conditions: (i) as control without stimulation, (ii) stimulation with soluble anti-CD3 antibody (3 µg/ml) only or (iii) combined stimulation with anti-CD3 antibody and sFasL (50 µg/ml, cross-linked through the FLAG/sequence "cross-linked").

After 0, 2, 4 6 and 22 hours cells were taken from the different preparations and lysated. The cell lysates were examined with the Western blot technique with regard to their caspase-8 activity (procaspase-8, 55 kDa fraction, or proteolytically cleaved, active caspase-8, 26 kDa fraction respectively).

A band of the active 26 kDa fraction appears only after stimulation with anti-CD3 antibody or more intensively after combined stimulation with sFasL. The active 26 kDa caspase-8 fraction, which is created through proteolysis from the 55 kDa fraction, is found in its highest combination four hours after the start of stimulation (Fig. 6).

In a further test approach inactive T lymphocytes were stimulated in the presence of the caspase inhibitor IETD-fmk (50  $\mu$ M) with anti-CD3 antibody and cross-linked sFasL (see above) and lysated 6 hours after the start of stimulation. In contrast to the test approach without a caspase inhibitor, the Western blot application does not lead to any 26 kDa band being detected (Fig. 6, on the right). This proves that the proteolytic cleavage of caspase-8 is also effectively blocked in the case of co-stimulation with sFasL through IETD-fmk.

### Claims

1. Use of a caspase inhibitor characterized by its inhibition of the proliferation of peripheral blood lymphocytes.
2. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 1 characterized by its inhibition of the proliferation of T lymphocytes.
3. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 1 or 2 characterized by its intracellular blocking of the transduction of signals stimulating cell proliferation through the reversible or irreversible inhibition of one or more caspases.
4. Use of a caspase inhibitor in accordance with one of the claims 1 to 3 characterized by its blocking the transduction of signals stimulating cell proliferation by inhibiting caspase-8.
5. Use of one or more caspase inhibitors to treat diseases, disorders or pathophysiological states characterized by these diseases, disorders or pathophysiological states being based on hyperproliferation of peripheral blood lymphocytes.
6. Use of a caspase inhibitor or of several caspase inhibitors to treat diseases, disorders or pathophysiological states in accordance with claim 5 characterized by these diseases, disorders or pathophysiological states being autoimmune diseases.
7. Use of a caspase inhibitor or of several caspase inhibitors to treat autoimmune diseases in accordance with claim 6 characterized by these autoimmune diseases being rheumatoid arthritis, systemic Lupus erythematosus, diabetes mellitus or multiple sclerosis.
8. Use of a caspase inhibitor or of several caspase inhibitors characterized by its/their being used to suppress the immune

system, in particular to suppress the immune response through PBL.

9. Use of a caspase inhibitor or of several caspase inhibitors in accordance with claim 8 characterized by its/their being used to suppress the immune response, in particular to suppress the immune response through PBL after allogenic cell, tissue or organ transplantations.

10. Use of a caspase inhibitor in accordance with one of the claims 1 to 9 characterized by its having a non-biologically occurring molecular structure.

11. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 10 characterized by its being an oligopeptide, in particular a tetrapeptide, or a polypeptide.

12. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 10 or 11 characterized by its having a modification at the N- or C-terminus as an oligopeptide or a polypeptide.

13. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 12 characterized by the C-terminus of the oligopeptide or polypeptide having an aldehyde derivative, a fluoromethylketone or an acyloxymethylketone.

14. Use of a caspase inhibitor in accordance with one of the claims 10 to 13 characterized by its containing the sequences VAD, IETD or YVAD as an oligopeptide or a polypeptide.

15. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 13 or 14 characterized by its being IETD-fmk.

16. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 13 or 14 characterized by its being zVAD-fmk.

17. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 13 or 14 characterized by its being YVAD-fmk.

18. Use of a caspase inhibitor in accordance with one of claims 1 to 9 characterized by its having biological origins.

19. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 18 characterized by its having viral, bacterial or eukaryotic origins.

20. Use of a caspase inhibitor in accordance with claim 18 characterized by its being the bacterial protein CrmA or a physiologically active partial sequence of CrmA.